

Abstract

Research on expression of HIV-1 *env* in baculovirus and insect cell expression system and the construction of a new transfer vector

Baculovirus / insect cell expression system (BEVS) is a kind of Eukaryotic expression system. This is a helper-independent recombinant virus vector that has used to express genes from many sources: bacteria, viruses, plant and mammals. It has high level expression and perfect post-transcription modification, such as intron cutting, glycosylation. The principle of BEVS is replacing the polyhedrin gene with the foreign gene, then the foreign gene can reach high level expression under the strong later promoter : PH promoter.

In this thesis, a improved BEVS named Bac-to-Bac expression system was established. The principle of this expression system bases on the transposition between a novel baculovirus shuttle vector (bacmid) that can replicate in *E. coli* as a plasmid and transfer vector which contain foreign gene. The bacmid is a recombinant virus that contains a mini-F replicon, a kanamycin resistance marker, and *att*-Tn7, the target site for the bacterial transposon Tn7. The transfer vector comprises a baculovirus promoter driving expression of a foreign gene that is flanked by the left and right ends of Tn7. The expression cassettes of transfer vector can transpose to the target bacmid in *E. coli* when Tn7 transposition functions are provided in *trans* by a helper plasmid. The foreign gene is expression when the resulting composite bacmid is introduced into insect cells. By the Bac-to-Bac expression system, the period of obtain a recombinant virus can be reduced to 6-7 days.

The modified green fluorescent protein(eGFP), fragment from pEGFP, Clontech) used as a report gene was expressed in the Bac-to-Bac system. On the basis of it, the research on the expression condition of Bac-to-Bac was performed. Since the fluorescent density of eGFP is in proportion to the expression level of eGFP, the 4010 fluorescent spectrophotometer (Hitachi) was used to detect the eGFP quantificationally. The result showed that the highest expression appeared on the third day after transfection. At the same time, the influence factor on the foreign protein expression was also preformed. The result suggested that different glucose concentration in the medium would influence the expression level of eGFP. When the concentration of glucose reached 24mM, highest expression of eGFP was detected. Other factors are under further research. After ten generations, six strain of eGFP recombinant baculoviruses still contain stable ability for producing eGFP.

On the other hand, two HIV-1 *env* genes: gp160 and gp41t (“t” means truncation, 12 hydrophobic a.a. from gp41 5'-end were truncated) were amplified from HIV-1 clone pNL4-3 by regular PCR. Two fragments were subcloned into the *Sma*I site of pBluescript KS plasmid. Then three transfer vectors: pFB-gp120-41p, pFB-gp41t and pFB-gp41p were constructed, and were screened out by the restriction enzyme. These transfer clones were used to transform the DH10Bac bacteria and spread on the LB plate with gentamicin, kanamycin, tetracycline, IPTG and X-gal. Then the white clones were selected and from them the recombinant viruses were

extracted. After the restriction enzyme analysis and PCR identification, the recombinant viruses were used to transfect Sf9 cell with the Lipofectin (Gibco BRL). The transfected cells were cultured in the TNM-FH medium with 10% fetal bovine serum (FBS) under 27°C. After three days culture, the supernatant and cell were collected. The cell was washed twice by extracting buffer and treated by ultrasonication (30sec for six times in ice bath). The supernatant of cracked cell and culture medium were detected for the activity of HIV-1-env by EIA and western-blot. The result of PAGE-SDS electrophoresis showed no obvious foreign protein band on the culture supernatant and cracked supernatant of transfected cell comparing with that of blank Sf9 cell . The result of activity detection by EIA showed that there is little activity detected in the culture supernatant and just weak immuno-activity detected in the lysis of transfected cell. Only the product of gp41t recombinant virus showed a weak band on the western-blot. According to the recent report, the unsuitable leading sequence may contribute to this phenomenon. This is the direction for further research.

In this thesis, a new transfer vector with melittin derived from honeybee was also constructed. At the aid of computer, we designed and synthesized four fragments containing two restriction enzyme BglII site in the 5' and 3' end respectively with two protecting bases, melittin gene, multiple clone site, 8His(s) used for purification by Ni mental affinity purification. The four DNA fragments were synthesized into the complete fragment by Double-Temperature method. The total length of synthesized fragment is 164 bp. After the 5' and 3' end were filled by Klenow, the fragment was subcloned into the single restriction enzyme site *EcoRV* of KS. Then fragment was cut out and cloned into the *EcoRI* and *HindIII* sites of transfer vector pFB. The recombinant plasmid was identified by restriction enzyme and 8% PAGE-DNA electrophoresis. This new transfer vector was named pFB-Melittin. This transfer vector is designed for the serum free medium culture. So the expression recombinant protein can be secreted outside of the cell by the help of leading melittin sequence. The purification procedure will be more convenient than before.

Keyword: Baculovirus expression system, HIV-1, *env*, GFP, melittin

目 录

摘要.....	2
一. 前言	
1. 昆虫细胞杆状病毒表达系统(BEVS)概况.....	4
2. HIV 包膜糖蛋白的研究进展	13
3. 本文研究的目的和内容.....	18
二. 材料与方法	
1. 实验仪器设备及试剂配方.....	19
2. 分子生物学方法.....	22
三. 结果与讨论	
1. eGFP 在 Bac-to-Bac 系统中的表达研究	
1.1 eGFP 转移载体的构建.....	37
1.2 eGFP 在 Bac-to-Bac 系统中的表达.....	39
1.3 eGFP 表达条件的初步研究.....	41
2. HIV 包膜糖蛋白在 Bac-to-Bac 系统中的表达研究	
2.1 HIV gp160 和 gp41 基因片段的克隆及鉴定分析.....	44
2.2 HIV-1gp120-41p、 gp41t 及 gp41p 转移载体的构建.....	46
2.3 HIV-1gp120-41p、 gp41t 及 gp41p 的表达研究.....	51
2.4 HIV-1 gp120-41p、 gp41t 及 gp41p 的免疫学活性检测.....	53
3. 新型转移载体的构建	
3.1 Q 片段的人工合成.....	55
3.2 pFB-Melittin 转移载体的构建.....	58
四. 小结.....	61
五. 参考文献.....	62
英文摘要.....	68
致谢	71

摘 要

昆虫细胞杆状病毒表达系统(BEVS)是真核表达系统的一种,以一种无需额外辅助的重组昆虫杆状病毒作为表达载体,目前已被应用来表达不同来源的基因,如细菌、病毒、植物和哺乳动物的基因。它具有表达产量高,蛋白经过完善的后处理过程,如内含子剪切、糖基化等特点。其原理是通过外源基因置换病毒的核

多角体蛋白基因,使外源基因在核多角体蛋白启动子下高效表达。本论文中采用 BEVS 表达 HIV-1 包膜蛋白,目的在于弥补原核表达系统不能表达大片段、高度糖基化的重组蛋白;并探索其应用在检测试剂中的前景。

本论文首先建立 Bac-to-Bac 表达系统。Bac-to-Bac 表达系统是建立在经过改造的尺蠖核多角体病毒 (AcNPV) 表达载体上,利用细菌的 Tn7 转座子在细菌中完成病毒的重组。再利用重组病毒转染昆虫细胞,使外源基因在昆虫细胞内表达。在此基础上,利用绿色荧光蛋白 (eGFP) 作为报告基因,初步研究 Bac-to-Bac 表达系统的表达条件。结果表明,在 Bac-to-Bac 系统中的蛋白最高表达量出现在感染后第三天。同时本论文还研究了培养基中葡萄糖浓度对蛋白表达量的影响,结果发现不同浓度的葡萄糖会对蛋白的表达量产生影响,当培养基中的葡萄糖浓度达到 24mM 时,蛋白的表达量达到最高。在 Bac-to-Bac 表达系统形成的重组病毒的稳定性方面,经过 10 代的感染,重组病毒仍然保持高水平的重组蛋白表达。

在此基础上,我们用 PCR 从含 HIV-1 全基因的 pNL4-3 质粒中调出 gp160 和 gp41 基因,在 KS 质粒上亚克隆,然后分别构建 HIV-1 的包膜蛋白基因的 pFastBac 转移载体: pFB-120-41p、pFB-41t 和 pFB-41p。经酶切鉴定后转化 DH10Bac,在含庆大霉素、卡那霉素、四环素、IPTG 以及 X-gal 的平板上筛选白色克隆,挑取白色菌落并提取重组病毒 DNA,经 PCR 鉴定有插入目的基因。利用 Lipofectin 转染昆虫 Sf9 细胞。用 TNM-FH 培养基 27℃ 培养三天后分别收集上清和细胞,细胞经洗涤和超声破碎,离心取上清,利用 HIV-1 阳性和阴性血清,应用 EIA 和 Western-blot 技术对重组蛋白进行活性检测。结果表明裂解上清的重组蛋白经 HIV-1 阳性和阴性血清检测,发现有良好的免疫学活性。但是培养上清几乎没有检测到表达重组蛋白,仅在细胞中含有少量的重组蛋白。可能与目的基因的引导序列不利于昆虫细胞的表达以及外源基因内含大片段的疏水区段有关。

本论文还尝试了构建一种新型的转移载体。首先利用计算机辅助设计并合成了四段人工片段,采用双温法 PCR 法合成约 160bp 的含蜂毒肽(melittin)基因、多克隆位点和 8His(s) 的人工片段。应用边切边连的方法亚克隆到 KS 质粒的 EcoRV 位点上。再由 EcoRI 和 HindIII 双酶切克隆到 pFB 的同样位点上。经酶切鉴定,证实获得新型转移载体 pFB-Melittin。该转移载体的构建可应用在无血清的培养中,通过蜂毒肽的携带作用将表达的蛋白分泌到细胞外,这将为重组蛋白的纯化提供了方便。

关键词: 昆虫细胞杆状病毒表达系统, HIV-1 包膜蛋白, 绿色荧光蛋白 (GFP), 蜂毒肽 (melittin)

厦门大学博硕士论文摘要库

一 前 言

(一) . 昆虫杆状病毒表达系统概况:

昆虫杆状病毒表达系统 (BEVS) 是一种无需依靠其他辅助条件, 以昆虫的杆状病毒作为载体, 重组的病毒在昆虫细胞中可高滴度地复制并表达外源基因的真核表达系统。1980 年, Burand 等^[1]报道了一种可感染不同株昆虫细胞的杆状病毒 (baculovirus)。1983 年, Smith 等^[2]首先报道了利用 BEVS 表达人 β -干扰素。至今 BEVS 已经被广泛地应用在几百种异源蛋白的表达, 包括病毒、细菌、真菌、植物、寄生虫、高等动物以及人的基因^[3]。它是目前真核表达外源蛋白的较常用的表达系统。

1. BEVS 的原理及特点

杆状病毒表达系统的原理是利用鳞翅目昆虫的核多角体病毒作为表达载体, 以外源基因置换病毒核多角体蛋白 (polyhedrin) 基因并表达外源蛋白。首先通过对含有包括了重组元件和核多角体蛋白启动子的转移载体进行常规的外源基因克隆, 再与病毒 DNA 共转染昆虫细胞, 在昆虫细胞内完成病毒的重组过程, 通过释放到培养上清中的重组病毒, 获得置换了病毒原有的核多角体蛋白基因的重组病毒。再次感染昆虫细胞, 收获细胞内和培养上清中的重组蛋白。

核多角体蛋白有以下几个特点: (1) 核多角体蛋白在迟晚期启动子—pH 的启动下在感染细胞中大量表达, 在感染的后期最高可达到细胞总蛋白的 30-50%。感染幼虫最高可达到总蛋白的 68%。(2) 核多角体蛋白是一种与病毒感染和复制无关的蛋白, 在组织培养的杆状病毒整个生活周期中为非必需蛋白。因此, 缺少了核多角体蛋白基因的重组的杆状病毒无需其他辅助条件也可以完成感染、复制和表达。(3) 缺失了核多角体蛋白的病毒具有独特的形态特征, 不同于通过同源重组而整合了外源基因的重组病毒, 这为重组病毒的筛选提供了便利。有了核多角体蛋白这些独特的性质, 又经过研究人员的进一步改进, 目前 BEVS 已逐渐发展成为一项常规的实验手段。

BEVS 具有以下几个方面的特点。1) 首先它不同于细菌的表达系统。由于是一种真核的表达系统, 即具有和哺乳动物细胞蛋白质相似的复杂修饰和后处理过程, 又有自身的特点。具体表现在以下几个方面: (a) 在昆虫细胞中的部分蛋白的脂化以十六烷基化取代了十四烷基化。(b) 可进行信号肽的剪切, 激素前导序列的切除以及多肽蛋白的剪切也有报道, 但其剪切效率与其他真核细胞有所不同。在精氨酸和赖氨酸富含区的蛋白酶内切效率极低。虽然细胞或物种特异性的蛋白酶对于蛋白的剪切是必需的, 但蛋白质锚定的序列在昆虫和脊椎动物中是保守的。因此, 蛋白质在昆虫细胞内可以被分泌和定位到核、或质膜、或内膜系统。(c) 蛋白质 α -乙酰化在培养细胞中没有发现, 但在幼虫和蛹中有报道。(d) 脊椎动物细胞中常见蛋白的 N-糖基化在昆虫细胞也一样, 但大部分的昆虫细胞来源的蛋白质 N-糖基化类型仅仅是高甘露糖型, 而不是加工成复合型的含有岩藻糖、半乳糖和唾液酸的复合型寡聚糖。O-糖基化不是昆虫细胞糖蛋白的特点, 因此该类型的糖基化不明显^[4]。2) 其次, BEVS 是以一种无需辅助条件就能够在昆虫细胞中高滴度地复制的杆状作为载体, 通过转移载体的构建以及病毒的重组, 可较快地获得重组病毒, 同样具有原核表达操作方便的优点。3) BEVS 通

过利用合适的细胞株，也具有大规模悬浮培养的优点，可以大量获得重组蛋白。且 BEVS 所表达的重组蛋白质大部分以可溶性蛋白的形式存在于昆虫细胞内或释放到培养基中。4)杆状病毒本身的基因组巨大，达到 130kb，因此可容纳大片段的外源基因。而细菌表达的蛋白一般不能超过 100kD，否则产量将明显减低。5)重组病毒在感染的细胞后 6 小时开始复制，并关闭宿主基因的表达，从而使重组病毒 mRNA 转录和病毒蛋白质得到高效表达。6)杆状病毒仅感染少数的节肢动物，对脊椎动物没有感染性，其启动子在动物细胞中也处于静默状态，这为表达特殊的癌基因或具有潜在毒性的蛋白质提供了一个优于其他表达系统的理想表达系统。与酵母表达系统相比，BEVS 具有和真实蛋白相近的糖基化位点，仅是糖基侧链的类型上有所不同。而酵母表达系统虽然也有明显的糖基化蛋白现象，但糖基化的位点与天然蛋白相比有所不同，因而不适合表达一些功能性蛋白。与哺乳动物细胞表达系统相比，BEVS 的表达量较高，而且杆状病毒不涉及转化细胞或潜在致癌的转化元件，因此操作的安全性也高。

2. BEVS 的研究进展

虽然 BEVS 表达系统出现至今才短短的 15 年时间，但在表达系统的各个组成部分都有了长足进展。目前，它已经发展成为一种重要的研究手段。下面将就系统中的几个部分分别进行综述。

2.1 病毒载体

目前，杆状病毒表达系统是用一种细胞溶解性的病毒：苜蓿尺蠖（草地夜蛾、粘秋虫）核多角体病毒（*Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus, AcNPV，以下简称杆状病毒）。该病毒是核多角体病毒（nuclear polyhedrosis virus, 简称 NPV）中的一种，是杆状病毒科的模式病毒，具有较好的研究背景。到目前为止，AcNPV 已发现 82 个基因，其中 28 个仅知道阅读框架（ORF），还未在转录和翻译水平上证实。AcNPV 基因的表达可分为 4 个时期：极早期、早期、晚期、迟晚期。极早期基因一般是反式调控基因（transactivator gene），依赖于 α -鹅膏蕈碱敏感的宿主 RNA 多聚酶。在早期基因启动子内发现了一些特征性的保守序列，ACGT(或 CAGT)和 GC 基元（motif），它们可能是宿主 RNA 多聚酶的识别位点。晚期基因由病毒编码的 RNA 多聚酶转录，在转录起始部位有 TAAG 保守序列。因此，早期和晚期基因的启动子具有明显的可识别特征。此外，目前发现的某些早期基因 5'端具有晚期基因的转录起始核心序列 TAAG，使它们分别于早期和晚期都能转录。并有证据表明，在 AcNPV 的基因中有嵌套编码现象。目前多株病毒基因组的图谱已经绘制，其中 C6 株全序列也已测序（GeneBank 序列号：L22858）。AcNPV 有着很宽的感染宿主范围，包括鳞翅目昆虫的 30 多个物种。它是一种巨大的外被胞膜的双链 DNA 病毒。杆状病毒表达系统是利用了病毒生活周期中的某些独特的性质，见图 1。

图 1. 昆虫杆状病毒的生活史^[5]

Fig 1. Baculovirus life cycle

无论在体内或体外环境下, 整个病毒生活周期可分成两个阶段: 早期和晚期。在早期, 感染细胞会释放出分泌胞外的病毒颗粒 (extracellular virus particles, ECV), 通过从感染细胞的质膜表面出芽得以释放。在生活周期的晚期, 出现核多角体包裹的病毒颗粒 (occluded virus particles, OV), 聚集在细胞核内, OV 型病毒是由病毒来源的单一核多角体蛋白包裹而成。OV 型病毒只在感染细胞后期, 细胞裂解后得以释放。包裹病毒的核多角体蛋白的作用是隔离和保护成百个的病毒颗粒, 不随着细胞的裂解而被蛋白酶裂解而失活; 相比之下, ECV 则对外界的不良环境敏感。核多角体蛋白是包裹颗粒的主要成分, 分子量为 29kD, 在感染后期, 核多角体蛋白聚集达到很高的水平, $1-2 \times 10^6$ 个感染细胞累积达 1mg/ml 的核多角体蛋白, 占细胞总蛋白的 30-50%。然而在体内, OV 则是杆状病毒生活周期的一个重要阶段, 它是病毒水平传播的一个重要形式, 即通过昆虫幼虫摄食被污染的植物, 进入幼虫的消化道, 但仅在中肠段的碱性环境下 OV 才开始解聚, 侵入昆虫的中肠组织, 并开始复制。病毒的二次感染则是以 ECV 的形式感染其他昆虫组织, 病毒颗粒通过吞噬或融合方式进入细胞后, 在核区脱去外膜。在感染 6 小时后开始复制, 在感染后 10 小时, ECV 通过出芽形式分泌。核多角体蛋白在感染 12 小时后被检测到, 并持续表达直至细胞裂解。OV 型病毒则要在野生病毒感染后 18-24 小时才出现。ECV 型病毒在 36-48 小时达到高峰, 而 OV 型病毒则在 5-6 天达到高峰, 表现有高折光性颗粒充斥细胞核。杆状病毒晚期基因的表达调控机制复杂, 表现在核多角体蛋白的表达与病毒的复制并不同步, 但其中的调控机理目前还不清楚。

近来家蚕核多角体病毒(BmNPV)已逐渐成为BEVS中病毒载体的研究热点。家蚕与尺蠖同属鳞翅目昆虫, 有着相似的遗传特性, 而家蚕又是一种经济昆虫, 资源丰富, 有很好的研究背景, 在AcNPV的研究基础上, BmNPV的研究发展迅速。目前在GenBank也已经有了BmNPV的全序列报道 (GenBank accession No. L33180)。相信在不远的将来, BmNPV会愈来愈受到研究人员的关注。

2.2 BEVS 中的细胞培养技术

在 BEVS 中, 最常用的昆虫细胞株是尺蠖 (*Spodoptera frugiperda*) 的

IPLB-SF-21AE 细胞株¹⁶⁾，简称 Sf21，以及 Sf21 的衍生细胞株 Sf9。Sf21 和 Sf9 都是来源于尺蠖的卵巢细胞，这两株细胞既适于贴壁培养也适于悬浮培养。另外，粉纹夜蛾 (*Trichoplusia ni*) 的 TN⁽⁷⁾ 细胞株也常见，如 TN-5B1-4 和 TN-368。Anderson 等¹⁸⁾ 通过比较，发现 Sf9 或 Sf21 产生重组病毒的能力是 TN 细胞的 10 倍。蛋白的高效表达要求有健康的培养细胞，即达到 90% 的成活率，倍增时间在 16-18 小时的对数增长前期细胞。蛋白的表达水平则因外源基因的性质而不同，基因的长度和外源基因引导序列的不同都会对表达量产生巨大的影响。此外，表达量低的原因还在于表达产物本身，即由于蛋白固有的特性，蛋白在细胞内的修饰和转运过程被降解而损失，或影响到了细胞正常的生理代谢而受到抑制。氨基酸密码子偏嗜性也是一个不容忽视的问题。mRNA 或蛋白的稳定性都还有待于进一步深入研究。Whitford 等¹⁹⁾ 通过研究 β -半乳糖苷酶在 Bac-to-BacTM 系统中的表达，发现当多重感染值 (MOI) 为 0.1 时，72 小时细胞内 β -半乳糖苷酶的表达量是 MOI 为 10 时的 3 倍。此外，病毒株的选用也很重要，同一个蛋白在不同病毒株中的其表达量也大相径庭。

一般认为，BEVS 适合表达细胞内蛋白，而不太适合表达膜蛋白。这是因为膜蛋白本身的某些特点：一般都有大片的疏水区，这些蛋白质在修饰过程中会嵌在细胞膜表面得不到释放；同时在蛋白成熟的过程，还常常伴随着复杂的糖基化的修饰过程，多肽前体必须进入内质网和高尔基体中进行修饰，仅有那些修饰完全的蛋白才能被释放到胞外。1993 年，Sridhar 等¹¹⁰⁾ 发现，糖基化程度与蛋白的分泌有着密切的关系，糖基化程度越高，蛋白的分泌量越大，而那些未被修饰或修饰不完全的蛋白则滞留在内膜系统或胞浆内，得不到释放，最终导致蛋白得不到充分的表达。为解决这个问题，许多研究人员进行了富有成效的探索。Gerald¹¹¹⁾ 等研究结果表明，在含有 2% 胎牛血清的培养基中培养的 Sf9 细胞，其膜成分中的胆固醇/磷酸脂的比例为 0.4，仅为高等真核细胞的 1/20。实验结果表明，BEVS 中，胆固醇是决定膜蛋白表达量高低的重要因素之一。

除了以上这一些因素外，培养基的选择也是影响重组蛋白表达的重要因素之一。常用的培养基有 Grace's Antherae, IPL-41, TC-100, Sf-900II, Ex-Cell 401 等。Grace's 培养基是一种相对简单，也是最常用的盐类、碳源和氨基酸的混合物基本培养基，适于短期的培养细胞，如洗涤单层细胞、活化细胞和转染细胞等。TNM-FM 是一种较复杂的适于常规培养单层或悬浮细胞，以 Grace's 培养基为基础，添加 3.3 克/升的酵母粉和 3.3 克/升的乳清蛋白水解粉的改良培养基。培养基中作为三羧酸循环 (TCA) 的主要碳源的葡萄糖和主要的能源的谷氨酰胺 (Asn) 是两个主要的成分，它们对目的蛋白的表达起着决定作用。不同培养基中葡萄糖的含量变化很大，从 4mM (Grace's 培养基) 到 28mM (EX-CELL400 培养基)，最高可达 35mM；Asn 的含量差别也很大，从 4mM (Grace's 培养基) 到 7mM (IPL-41 培养基)，最高可达 16mM。Raghunand¹¹⁴⁾ 等通过对悬浮培养 Sf9 细胞的培养基中的几个指标进行了研究，葡萄糖的需求量是 7-35mM 之间，谷氨酰胺的含量在 4-16mM 之间，细胞约有 15-20% 的能量需求来自于基本功能要求而与生长无关。Wang 等¹¹⁵⁾ 研究表明，培养过程中通过添加适量的葡萄糖和谷氨酰胺可将表达量提高 100%。另外两种培养基 Sf-900II 和 Ex-Cell 401 为无血清培养基，这两种培养基是一种无蛋白培养基，即通过添加一些血清的替代物，如鱼肝油、胆固醇、维生素 E 以及适当的乳化剂等，为分泌型表达蛋白的纯化提供了方便。在悬浮培养中，培养基中溶氧量是影响表达量的主要因素之一，实验结果表明，培养的氧含量对于病毒的复制和重组蛋白的高效表达具有重要的作用。当

培养基中的溶氧量达到 35% 饱和度时, 可使总蛋白量提高 200%, 目的蛋白可提高 100%。此外, Horiuchi 等^[16] 还尝试了用经济昆虫表达目的基因的可行性, 并取得了满意的效果。

2.3 BEVS 的转移载体

转移载体是杆状病毒表达系统一个重要部分, 最近的研究进展表现在两个方面: 便于重组病毒获得的载体和有假病毒形成能力的载体, 并朝着在哺乳动物细胞中表达的方向发展。因此研究重点主要放在与增强病毒重组和基因的转录和翻译的研究上, 在此基础上构建种类多样的转移载体, 而选择一个合适的转移载体也是表达成功的前提之一。

目前的转移载体都是由以下几个部分组成: 1) *E. coli* 的高效复制子 (ori), 目前的许多转移载体都选用了 pUC18/19 的高效复制子。2) 杆状病毒表达启动子, 如晚期 PH 启动子、迟晚期 p10 启动子或 AcNPV 的其他基本蛋白启动子。目前常用的还是 PH 和 p10 这两个晚期的启动子, 如 pAcUW^[25] 系列, 这使一株重组病毒表达多个目的基因成为可能。此外, 作为影响基因表达的 IE1 结构域^[17] 和 HR1^[18] (homologous region sequence) 也是杆状病毒表达系统近来研究的热点。作为双功能结构域, IE1 是病毒在昆虫细胞中的多个启动子的反式激活蛋白, 同时又是 DNA 的结合区, 可刺激蛋白质的转录开始。同样 HR1 也是一种双功能结构域, 一方面含有病毒复制的起始序列 (ori), 另一方面也发挥了增强转录的作用。3) 大片段的重组区以及多克隆位点。早期的转移载体多为融合载体, 即保留了核多角体蛋白的 ATG, 所表达的蛋白质 N 端融合了部分核多角体蛋白的序列, 如 pAcX、pVLX、pEVX 系列载体^[12]。这一系列的载体普遍有表达量高的特点, 这可能与后续的基因共用了核多角体蛋白的引导序列有关。在引导序列研究方面, Nishihara 等^[13] 通过用狂犬病毒 G 蛋白的信号肽序列 (SP) 替换 HCV-NS1 的 N 端 SP 序列, 同时去除 C 端的疏水区段, 使表达的 HCV-NS1 重组蛋白不会嵌在昆虫细胞膜上而得不到分泌。Tessier^[12] 等也报道了, 在目的基因融合了蜜蜂的一段信号肽—Melittin 后, 重组蛋白分泌到细胞外的量可提高 5 倍。后来出现的非融合载体, 即将 PH 原有的 ATG 突变为寂寞密码子, 如 ATT。或者直接切除 ATG 附近的部分序列, 包括上游和下游, 使翻译的起始从目的基因本身的 ATG 开始, 并到目的基因的终止密码子结束。一般认为 PH 上游从转录起始点到 ATG 之间的序列对于目的基因的高效表达有重要作用。4) 合适的报告基因及抗性基因。现在出现了许多含有报告基因的融合转移载体, 如 GFP、BFP、YFP^[19]、*LacZ*^[20] 基因以及细菌的荧光素酶^[21] 等。这些改进提高了挑斑的直观性, 大大便利了重组病毒的获得。抗性基因一般采用氨苄抗性基因, 这主要便于在细菌中操作。另外有的载体还含有其他抗性基因, 如庆大霉素和新霉素抗性基因。5) 与蛋白纯化有关的部件。在载体的改造方面, 还相继发展了许多便于纯化的载体, 如 GST 融合载体^[22], 带 Poly(His) 的载体^[23] 以及便于免疫检测的载体^[24] 等。另外提高蛋白分泌到胞外的带信号肽的新型转移载体也有报道。6) 与病毒重组有关的元件。目前常用的载体中都含有大片段的杆状病毒核多角体蛋白上游和下游的与重组有关的序列。

一般认为在构建转移载体方面, 应注意以下几个方面: 1) 对于融合转移载体, 应尽可能地减少 5' 端的非编码引导序列。同时由于核多角体蛋白的引导序列中富含 A-T, 因此一般建议 G-C 丰富的区段在克隆到转移载体上之前要尽可能切除; 而对于非融合转移载体则要求外源基因本身带有合适的引导序列。3) 除了核多角体蛋白本身的多聚腺苷酸之外, 外源基因最好有自己的多聚腺苷酸。4)

基因内部最好不含有内含子。5)考虑昆虫细胞和目的基因的氨基酸密码子偏嗜性。

2.4 病毒的重组技术

正如前面提到的, 进一步提高和方便重组病毒的获得是决定BEVS能否广泛应用的前提之一。然而在转移载体与病毒的重组研究方面, 转移载体与AcNPV的同源重组的发生概率一般极低, 在0.2%-5%之间。经典的操作方法较繁琐, 重组病毒得率也低, 必须通过多次的空斑筛选, 这一步是关系杆状病毒表达成败的关键步骤。常用的方法是限量病毒滴度稀释法, Farmer等^[126]报道了流式细胞仪筛选重组病毒。但所有这些方法都必须经过病毒空斑实验来确证, 即重组病毒感染昆虫细胞后, 铺上低融点胶, 2-3天后观察空斑细胞的病毒形态, 无高折光性的包裹病毒形成的才是重组病毒克隆。一般空斑筛选要进行多次, 否则, 几轮表达后, 重组病毒将由于野生病毒的竞争而逐渐丢失。除了空斑实验外, DNA斑点杂交法, 免疫检测和PCR也常被用作重组病毒的鉴定。为了简化挑斑的步骤, 研究人员发展了线性病毒代替野生病毒的方法。1990年, Kitts^[127]等发现在酵母和哺乳动物细胞中, 当DNA含有双链断点时, 其发生重组的效率比闭合环状的DNA高出许多, 而在杆状病毒中也有同样的现象。通过在插入位点的附近用一个或多个的单一位点进行线性化, 这样就可望获10-25%的重组率。一般做法是在核多角体蛋白基因内部引入病毒基因组中没有的单一酶切位点: Bsu36I, 以便于外源基因插入病毒基因组, 而线性化病毒的感染率仅为环化病毒的1/15-1/150。之后, 又出现了缺失了核多角体蛋白下游的部分必需基因的线性化病毒, 同时引入了*LacZ*基因, 如BacPAK6线性病毒, 使重组率进一步提高到80%。具体是以pH启动的编码 β -半乳糖苷酶的*LacZ*基因替代核多角体蛋白基因插入病毒基因组中, 而不改变氨基酸的阅读框架。同时利用位于*LacZ*基因和核多角体蛋白基因下游的第1629号阅读框中Bsu36I内切酶, 切除部分病毒必需序列, 获得缺失了部分基因的线性化的重组病毒。与克隆了外源基因的转移载体共转染昆虫细胞, 可通过蓝白斑筛选重组病毒, 就可获得补充了转移载体上的必需序列的完整的重组病毒。可使重组病毒的得率提高到88%-99%。1992年, Patel^[128]等报道通过构建可在啤酒酵母中通过同源重组而获得重组病毒的方法, 但该方法有两个缺点: 转移载体转化酵母的效率太低, 仅为细菌的 $1/10^3 \sim 10^4$; 同时在转染细胞之前还要通过蔗糖密度梯度离心的方法来纯化重组病毒。Peakman等^[129]利用噬菌体P1的Cre-lax来完成病毒的胞内重组, 尽管可以达到50%的子代病毒重组率, 但该方法的重组可能是多拷贝的插入重组, 同样需要多次纯化。1993年, Luckow^[130]等报道一种位点特异的、通过转移载体中的Tn7和整合在病毒上att-Tn7转座子位点, 在细菌内将外源基因插入经过改造的昆虫细胞和细菌穿梭杆状病毒载体(bacmid)中, 同时在细菌中扩增重组病毒。这是一种快速、稳定、高效的获得重组病毒的方法。该系统所采用的Tn7转座子比噬菌体Cre-lax整合优越在于Tn的转座有一种“转座免疫”现象, 即Tn7左右臂所包括的外源DNA可高频度地、单一地整合到att-Tn7位点中, 不会出现在同一个质粒中发生两次转座。近来随着对病毒基因组的进一步了解, 有了更为方便简洁的实验方案, 即分别通过含有核多角体蛋白上游和下游的重组元件序列(约50bp)的引物直接扩增目的基因, 再与病毒共转染昆虫细胞, 一步就可以获得重组病毒^[31]。应用该技术已经成功地获得 β -半乳糖苷酶和绿色荧光蛋白的重组病毒。

3. 昆虫杆状病毒表达系统的应用

正如前文所述, BEVS 作为一种的常规实验手段, 被广泛地应用在生物学研究的各个领域。作为一种真核表达系统, 它所表达的蛋白经过复杂和较完善的修饰, 因而与天然蛋白有着相同或相近的性质。以下分三个方面来加以介绍。

§ 3.1 昆虫杆状病毒表达系统在功能性研究方面的应用

在功能性研究方面, 目前BEVS成功地应用在抗体、酶、受体、细胞因子、病毒蛋白等的表达。由于BEVS所表达的蛋白具有丰富的N-联糖基化和少量的O-联糖基化, 尤其适用于高度糖基化的蛋白质的功能研究。Bei等^[132]利用EBVS表达了单抗来源的单链免疫球蛋白和白介2 (IL-2) 的可分泌到培养基中融合蛋白, 这种融合蛋白以二聚体形式分泌, 分子量分别为115kD和140kD。糖基化分析为高甘露糖型。通过检测, 这种重组蛋白兼有了免疫球蛋白和IL-2的特性, 并可望进入临床试验。在受体表达方面, Loisel等^[133]在BEVS中表达了人- β 2-肾上腺素受体 (β 2-AR)。在细胞因子方面, Prodinger等^[134]在BEVS系统中表达了B-淋巴细胞膜蛋白受体CD21的功能区段, 并能在补体反应中发挥作用。这也为进一步研究B-淋巴细胞的免疫调节提供了一种有力的手段。最近Ernst等^[135]还利用BEVS作为配体的筛选工具, 用于制作和筛选真核表达的表位文库。文中报道了将HIV-1-gp41的中和抗体表位‘ELDKWA’插入流感病毒的凝血酶B抗原位点, 共同在昆虫细胞表面表达。通过荧光筛选, 可一步获得表达高结合能力的抗体表位的重组病毒。在病毒蛋白研究方面, BEVS被应用在HIV-1的包膜蛋白糖基化研究方面, Yeh等^[136]在BEVS中表达了gp120, 通过氨基酸变异和氨基酸测序, 发现重组的gp120(rgp120)中所有N-联糖基化位点都能被利用来糖基化。在O-联糖基化方面, 由于只检测到甘露糖和N-乙酰葡萄糖胺而未检测到N-乙酰半乳糖胺, 表明rgp120中没有典型的O-联糖基化现象。所有的rgp120糖肽都是高甘露糖型N-联寡聚糖, 从GlcNAc2Man5到GlcNAc2Man9不等。Butters等^[137]进一步研究了BEVS系统表达的rgp120, 发现rgp120的糖基化形式与脊椎动物的糖基化有着相似的反应, 它的主要糖基形式包含了30%的已经发现的糖基类型。即海藻糖的核心结构, 甘露糖 α 1, 6 (甘露糖 α 1, 3) 一甘露糖 β 1, 4乙酰葡萄糖 (海藻糖 α 1, 6) 乙酰葡萄糖。此外, Murphy等^[138]利用杆状病毒自身的Egt基因和p67的信号肽来引导HIV-1gp120的表达, 一方面提高了表达量, 同时也提高了蛋白的分泌量。Tobin等^[39]利用BEVS表达的HIV-1 gag前体蛋白可在细胞膜表面组装成病毒样颗粒(VLPs), 这提示了这种病毒样颗粒可用来包装其他多肽的可能性。由于反转录病毒具有的移码阅读机制, 如通过移码阅读表达gag-pol融合蛋白中pol基因产物。将包含了HIV-1包膜蛋白gp120的C端65%的序列插入gag-pol阅读框架中, 紧接在gag的终止密码子后面。通过免疫电镜可看到大量嵌合了gp120部分蛋白的病毒样颗粒。用gp120单抗Western-blot进一步证实了这一点。用它来免疫小鼠可获得同时针对HIV-1 gag和env表位的细胞毒反应, 以及针对gag表位的体液免疫反应。这表明嵌合的gag-gp120病毒样颗粒可作为HIV-1疫苗进一步研究, 为HIV-1感染的免疫治疗提供一种手段。同时也开拓了利用移码机制包装其他病毒蛋白和细胞蛋白的前景。总之, 由于杆状病毒的自身特点, 使其在表达糖基化蛋白和假病毒形成能力上体现出优于其他表达系统的优越性, 在功能性蛋白的研究中将发挥重要的作用。

§ 3.2 昆虫杆状病毒表达系统在疫苗研究方面的应用

BEVS 在疫苗研究方面有独特的优势。首先作为表达载体的杆状病毒能够包容较大的外源基因, 为表达大蛋白疫苗提供了方便。其次, 许多病毒的壳蛋

白(gag)基因在 BEVS 中不仅可得到表达, 同时还能被正确地剪切, 组装成病毒样的假病毒颗粒, 可以通过与疫苗基因的融合表达, 更好地为表达的疫苗提供了一个良好的转载系统。目前正广泛地应用在多种哺乳动物病毒、寄生虫、以及人癌胚抗原的表达。Deml 等⁽⁴⁰⁾利用 BEVS 表达了以 HIV-1-Pr55(gag)为载体, 用 EBV 的跨膜蛋白 gp220/350 替代 gp160 中的 gp41 部分, 这样可以大大提高 Pr55(gag)病毒样颗粒表面的 HIVgp120 多聚体的量。Hotamitchell 等⁽⁴¹⁾利用 BEVS 表达血吸虫顶浆膜上的钙蛋白酶大亚基 Sm-p80, 发现 Sm-p80 可被人体内的 IgA、IgM、IgG1 和 IgG3 所识别, 作为抗原免疫小鼠后可提高对血吸虫的抗感染性。这提示了 BEVS 表达的 Sm-p80 有可能作为抗血吸虫感染疫苗。Bei 等⁽⁴²⁾利用 BEVS 表达抗肿瘤抗原—癌胚抗原(CEA), 一种分子量为 180kD 的糖蛋白—rV-CEA。用 rV-CEA 替代由肝脏中提取的天然 CEA 作为疫苗免疫癌症病人, 一方面可以减少非特异性交叉反应; 另一方面也解决由于长期使用 CEA 所导致的免疫记忆。尽管与天然 CEA 相比 rV-CEA 的糖基化的类型不同, 但 rV-CEA 中至少包含了天然 CEA 中的 10 个 B 细胞表位, 而且能够在结肠癌病人体内引发体液免疫应答。进一步实验结果表明其在免疫了 CEA 之后再使用 rV-CEA 比单独使用 rV-CEA 效果更明显。综上所述, 作为真核表达系统的一种, BEVS 能够表达分子量较大、具有良好免疫原性的蛋白质, 在疫苗研究方面有着广阔的应用前景。

§3.3 昆虫杆状病毒表达系统在检测试剂研究方面的应用

与 BEVS 表达的重组蛋白在疫苗中的应用一样, 在检测试剂应用方面也有许多成功的报道, 主要应用在病毒、寄生虫的检测方面。在病毒检测方面, Nishihara 等⁽¹³⁾在 BEVS 通过改造 HCV-NS1 的引导序列和削去 C 端的疏水序列, 使表达的重组 HCV-NS1 高效表达并大量分泌到培养基中。利用重组蛋白检测慢性丙型肝炎病人血清, 阳性检出率达到 92%。在寄生虫检测方面, Dossantos 等⁽⁴³⁾在 BEVS 中表达锥虫鞭毛重复抗原(FRA), 无论细胞内蛋白还是培养上清中的重组蛋白与纯化的细菌表达蛋白有着同样的反应。另外, Haubruck 等⁽⁴⁴⁾用 BEVS 表达人甲状腺过氧化物酶(TPO), 重组 TPO(rTPO)可完全分泌到培养基中。利用重组 TPO 检测人血清中的抗 TPO 自身抗体, 诊断人的甲状腺自身免疫症, 检测结果表明, rTPO 与从甲状腺中提取的天然 TPO 具有 91% 的检测符合率。由此可见, BEVS 表达蛋白已经广泛应用在检测试剂的研究中, 随着表达系统的进一步完善, 更好更廉价的抗原将大量应用在检测试剂的生产中。

(二). HIV 包膜蛋白结构和功能的研究进展

人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV-1 和 HIV-2)以及猴免疫缺陷病毒(SIV)分别是各自宿主人和猴的获得性免疫缺陷综合症的病原微生物^[45], 目前它正以势不可挡的发展势头在世界各大洲广泛传播, 成为危及人类生存的一大病害, 同时也是广大科研工作者长期的研究热点。其中包膜蛋白的研究尤为重要, 它的研究对于检测艾滋病毒并防止艾滋病毒的传播有着重要的作用。下面将分 6 个方面来综述 HIV-1 包膜蛋白的研究进展。

1 HIV-1 包膜蛋白的合成和聚合研究

艾滋病人的典型表现是在病毒感染初期有高水平的病毒血症, 之后进入一个相当长的潜伏期, 并保留低水平的病毒复制。在病毒潜伏期间没有特异性的抗病毒免疫反应, 机体也不会产生中和抗体。初次感染的病毒和其他所有的反转录病

毒一样，被一层包膜所覆盖，这一层包膜是由宿主来源的双层脂质膜和病毒来源的糖基化蛋白质组成¹⁴⁶⁾。在病毒进入靶细胞之前，由病毒蛋白介导发生病毒的膜与细胞膜相融合，这些裸露的蛋白质一方面有利于发挥自身的功能，同时也导致中和抗体的产生。于是，在病毒复制和免疫的双重压力的选择之下，加快了包膜蛋白的进化历程，并在每一个感染细胞中发生着变异。再次感染的细胞中，包膜糖蛋白在粗糙型内质网中首先形成由 845-870 个残基组成的多肽前体，分子量约为 88kD。接着在糖基化单元：Asn-X-Ser/Thr 中的天门冬酰胺残基位联上高甘露糖型糖基侧链，形成 gp160 糖蛋白，并聚集成寡聚复合体。实验结果表明，该聚合体是三聚体¹⁴⁷⁾。三聚体 gp160 转运至高尔基体内，由细胞蛋白酶剪切成成熟的包膜糖蛋白 gp120 和穿膜糖蛋白 gp41¹⁴⁶⁾。gp41 含有一个胞外结构域，这很大程度上决定了三聚体的形成¹⁴⁸⁾，一个跨膜锚定区和一段长的胞浆区尾巴。暴露在细胞外成熟的寡聚包膜糖蛋白绝大部分是 gp120 糖蛋白部分。gp120 的糖基化修饰发生在高尔基体内，通过选择性地加上复合型糖基侧链，这将保证它更好地暴露在胞外。gp120 和 gp41 糖蛋白通过非共价键以不稳定的三聚体形式存在。它们非共价结合发生在 gp41 的胞外结构域和 gp120 非连续氨基端和羧基端复合位点¹⁴⁹⁾，见图 2。

当他们到达敏感细胞表面时，一小部分包膜糖蛋白复合体合并形成出芽的病毒颗粒，这时大部分的复合体解聚，释放 gp120 并暴露出原来被包裹的 gp41 胞外结构域。这是反转录病毒形成缺陷病毒颗粒典型的特征。

图 2. HIV-1 进入细胞的过程

Fig 2. HIV-1 enter the CD4+ cell

三聚体 HIV-1 包膜糖蛋白锚定在

病毒的外膜上(上)，靶细胞表面的

CD4 分子和趋化因子受体(CCR5)(下)

2. HIV-1 包膜蛋白与 CD4 的结合研究

HIV 的核心蛋白和各种酶蛋白序列是相当保守的，即使是在 HIV-1，HIV-2 以及 SIV 之间，也有很高的同源性。这可能是因为病毒组装和酶活性的要求限制了变异范围。变异主要发生在包膜蛋白上，不同地区分离的毒株间 gp160 氨基酸序列有 20% 以上的变异。根据序列比较各区段氨基酸的变异程度，gp160 可分为 5 个变异区(V1-V5)和 6 个保守区(C1-C6)。位于 gp120 的依次为 C1(38-134)，V1(135-154)，C2(204-279)，V3(300-330)，V4(396-414)，C3(415-458)，V5(459-468)，C4(470-510)。位于 gp41 上的有 C5(511-616)和 C6(654-745)。gp160 的变异主要集中于 V1-V5，其中最重要的是含有主要中和决定簇(principal neutralization determinant, PND)的 V3 区。PND 通过 gp120 分子中第 303-338 位两个半胱氨酸残基二硫键的作用，使 4 个变异区形成一个大的环状结构¹⁵⁴⁾，它具有很强的抗原性，可刺激机体产生特异性中和抗体。而 C 区的氨基酸序列是相当保守的。可以认为 HIV 的变异是病毒逃避宿主免疫反应的主要机制。许多细胞表面蛋白，包括粘附分子，都可以与 HIV-1 病毒颗粒的胞膜糖蛋白一起发生非特异性结合¹⁵⁰⁾。这些宿主来源的大分子会帮助病毒粘附到特定的靶细胞表面。病毒的粘附导致了 gp120 与特异性受体 CD4 糖蛋白和其他趋化因子受体家族成员的结合¹⁵¹⁾。CD4 糖蛋白在 T 淋巴细胞、单核细胞、树枝样细胞以及脑小胶质细胞表面均有表达，这些细胞是体内环境下初始病毒感染的主要靶细胞。CD4 的一个主要功

能是诱导 gp120 的构象变化并促使与趋化因子结合的受体位点的形成或暴露¹⁵²⁾。至今已有许多实验结果揭示了 CD4 与 HIV gp120 结合的结构基础。抗体结合和缺失突变实验表明

图 3. HIV-1-gp120 表面图

Fig 3. Surface of HIV-1-gp120

- A. HIV-1gp120 的核心区，箭头指向病毒的包膜
- B. gp120 核心区保守的中和表位
- C. gp120 的整体结构图
- D. gp120 核心的不同表面对抗体的反应

主要的变异环都被很好地暴露在 gp120 表面^{155, 56)}，而保守的区域则折叠在 gp120 的核心区。近来对 gp120 与 CD4 复合体的晶体衍射实验和中和抗体实验证实了这一点。

3. HIV-1 gp41 介导的膜融合研究

通过与流感病毒凝血酶的比较，HIV-1gp41 的胞外结构域在病毒进入细胞的过程中可能发生了构象的变化¹⁵⁸⁾。gp41 的疏水氨基端（融合肽）会嵌入靶细胞的细胞膜，近来的缺失突变实验以及 HIV-gp41 的胞外结构域晶体结构证实了这个模型。gp41 的胞外结构域暴露出一个呈伸展的、由三个盘状聚合体形成的结构，使其具备了连接病毒和靶细胞膜的能力。而 gp41 靠近跨膜区中其他螺旋结构与盘状聚合体的内旋大沟之间的相互作用对于 gp41 发生与融合相关的构象改变有着重要的作用。这种相互的作用可以被 gp41 的螺旋区的任意一个多肽段所阻断，表明了该区有希望成为一个可供结合小分子量干扰物质的潜在靶位点。

4. 膜蛋白糖基化与抗原性和免疫原性的关系

膜蛋白的糖基化对于其作为抗原物质和免疫原都起着重要的决定作用。无论是病毒颗粒还是感染细胞表面的糖基化蛋白都可以被抗体所阻断而失去其基本的功能。然而，病毒的持续感染现象表明病毒的糖基化蛋白已经进化成低免疫原性蛋白，已经不是一个理想的抗原物质了。而不同病毒株糖基化蛋白中的保守区段对于人体免疫系统的呈现性较差，使其可以成功地躲避免疫系统的攻击。gp120 表面的保守区段中与它的三个基本的结合配体：gp41、CD4 和趋化因子受体结合位点中每一个部分在引发抗体产生和对中和抗体敏感性上都表现出很大的缺陷。如 gp120-gp41 结合部位被包埋在包膜糖蛋白的穗状功能区的内部¹⁵⁷⁾。CD4 结合区呈凹陷状，被糖基化程度较高的可变区包围着¹⁵⁹⁾，而趋化因子受体结合区的又被可变环所笼罩，可能是 V3 和 V2(见图 3, C)，甚至在已经分析了结构，相对保守的 HIV-1 gp120 核心区，它的外在区段也表现出可变的和高度糖基化的特点。由于绝大部分的糖基侧链本身就可以竞争地提呈给免疫系统，因此高度的糖基化反而包裹了 gp120，降低了其作为免疫原靶位的能力。晶体结构分析表明，gp120 核心区有三个大的免疫静默区(见图 3, D)。尽管抗体能有效地发挥抗病毒的作用，但并不能完全抑制病毒在感染的宿主细胞内的复制，人体免疫系统限制病毒传播至少包括两个方面：病毒的隔离直至中和以及临时模式（temporary model）的中和抗体产生。经细胞传代的 HIV-1 病毒对中和抗体和可

溶性 CD4 的敏感性比原代病毒高。虽然包膜糖蛋白的其他区段也导致这种现象的发生,但主要的决定因素还是 gp120 上的可变环: V1、V2 或 V3¹⁶⁰⁾。gp120 与 CD4 相关表位的暴露程度降低是原代分离病毒之所以对中和抗体敏感性低的原因,这种暴露程度的降低在寡聚复合体中尤为明显。一种可能的解释是主要的可变环相互影响,紧密地结合在一起,从而阻碍了抗体与 gp120 相关表位的作用。

5. HIV-1 包膜蛋白引发机体免疫反应的研究

正如前面提到的, gp120-gp41 的非共价结合是形成功能性包膜糖蛋白三聚体的主要原因。自然感染过程中,解聚的包膜蛋白会明显地引发针对这些病毒组分的抗体产生。实验证明, gp120-gp41 的结合区域有较强的免疫原性¹⁶¹⁾;然而,由于自身抗体不能结合那些已经聚合的功能性包膜蛋白复合体,所以,尽管感染 2-3 周的 HIV-1 感染者的血清中可以检测到针对性的抗体,但许多的抗体缺乏抑制病毒感染的能力,等到了中和抗体形成时, HIV-1 已经牢固地侵入宿主细胞了。感染病毒后几周,初期的高水平的病毒血症会缓解,中和抗体随之可在感染动物和人体中检测到。这种抗体有较强的专一性,对不同株的病毒往往没有或仅有弱的反应。这一系列的病毒株特异性抗体都会识别 HIV-1 的 V3 环,而且能阻断与趋化因子受体的结合。当然, gp120 上的其他可变区段也会引发株特异性抗体的产生,如针对 gp120 的 V2 环的抗体也有中和活性¹⁶²⁾。与 V2 环有关的中和抗体表位是典型的构象表位。其他一些与 V2 和 V3 环有关的抗体可识别一株以上的 HIV-1 病毒¹⁶³⁾,这种现象表明这些主要的可变环仅呈现出有限的几种构象,这与可变环上的氨基酸残基的保守性一致。同时与趋化因子的结合要求也限制了 V3 环的变异。V2 环尽管在一些培养病毒中表现出与复制无关,但它可以帮助隔离 V3 环和趋化因子结合位点附近的表位,防止中和抗体的作用。所以紧靠在趋化因子结合位点的 V2 和 V3 环包裹了大部分 gp120 中的保守位点,同时又以多样性的变异表位呈现在机体免疫系统面前。在 HIV-1 感染后期,人体内的抗体可以中和较为广泛的 HIV-1 分离株,这些广谱的抗体会阻扰 gp120 和 CD4 的结合。从感染 HIV-1 的病人中分离到的一株单克隆抗体可以识别广谱的 gp120 糖蛋白,同时阻断 gp120 和 CD4 的结合,还可中和病毒感染¹⁶⁴⁾。通过突变分析,非连续性表位即 CD4BS 表位可被许多株人单克隆抗体所识别。gp120 中抗体结合位点全部存在于与 CD4 结合的区域,一些最重要的残基位于开放的深沟内,(见图 3, B)。因此,一些广谱的抗体进入到更凹陷的 CD4 结合区域。这与观察到的 gp120-CD4 结合面和典型的抗原-抗体复合体大小一样的现象一致。

6. 包膜蛋白作为疫苗的研究

由于免疫压力的筛选, HIV 及 SIV 的包膜蛋白渐渐向着低免疫原性进化。这严重阻碍了病毒疫苗的发展。而包膜蛋白以复合体形式存在也保护了其功能性结构免受免疫系统的攻击。

然而,随着包膜复合体的解聚, gp120 暴露出的 N 端和 C 端部分可以引发非中和抗体的形成;而 gp120 的可变环则可引发重要的中和抗体。但至今为止,关于 gp120 的 V2 和 V3 可变环中的保守序列是否有助于疫苗的设计以及疫苗中是否必须包容可变区与形成构象表位有关的所有功能性结构仍是个未知数。

gp120 中的结合位点多为非连续性结构组成,而这些非连续的结构序列又是相当保守的。这与宿主细胞表面受体极少多态性是一致的。与其他趋化因子结合位点相比, CD4 结合位点是一个理想的抗体结合靶位点,许多中和抗体就是针

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.